

B₁₂ vitamin tartalmú, bukkális gyógyszerhordozó rendszer formulálása, mikro- és makroszerkezetének vizsgálata

Doktori tézisek

Szabó Barnabás

Semmelweis Egyetem Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Zelkó Romána, egyetemi tanár, D.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Révész Piroska, egyetemi tanár, D.Sc.

Dr. Stampf György, egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Klebovich Imre, egyetemi tanár, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Ludányi Krisztina, egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Homonnay Zoltán, egyetemi tanár, D.Sc.

Budapest

2012

Bevezetés

A vészes vérszegénység (*anaemia perniciosa*) gyakori oka a B₁₂ vitamin (cianokobalamin) hiánya. A terápiás gyakorlatban az izomba adott (intramuszkuláris, i.m.) injekciós formát alkalmazzák a vitamin rossz orális biohasznosulása miatt. A B₁₂ vitamin szükséges napi dózisa mindössze 0,4-2,8 µg, az egészséges emberi máj ráadásul 2 évre elegendő mennyiséget is képes tárolni belőle.

A cianokobalamin nagy (M=1355,7 g/mol) molekulatömege ellenére tanulmányok bizonyítják, hogy képes passzív diffúzióval átjutni a nyálkahártyák membránjain, amely lehetővé teszi a hatóanyag neminvazív alkalmazását.

Rossz biohasznosulása és jó oldhatósága miatt a Biofarmáciai Osztályozási Rendszer (BSC) 3. osztályába tartozik, így olyan formulációban alkalmazható sikeresen, amely elegendő időt biztosít a hatóanyag számára a membránon való átjutáshoz.

A bukkális gyógyszerformák alkalmazása számos előnnyel jár, mivel a nyálkahártya erekkel gazdagon átszőtt és permeábilis, a farmakon alkalmas szisztémás kezelésre is. Ez igen kedvező, mert az innen felszívódott hatóanyag kikerüli a májat, valamint az emésztőrendszer bontó enzimejei sem hatnak rá. Megfelelően bioadhezív polimerek alkalmazásával a formulák a száj nyálkahártyájához tapaszthatók, így segítve a membránon át történő hatóanyag-felszívódást.

A gyógyszerformák alkalmazhatóságát a mikro- és makroszerkezetük együttesen határozzák meg. A kis mintaigényű, univerzális mikroszerkezet vizsgálati módszerek alkalmazása mind a formulálás mind a készítmény

vizsgálata során hatékony eszköz a széleskörűen alkalmazott makroszerkezeti módszerek (szilárdság, hatóanyag-leadási kinetika) kiegészítésére.

Célkitűzés

Munkám célkitűzései a következők voltak:

- B₁₂ hatóanyag tartalmú bukkális filmek formulálása,
- a megfelelő segédanyag-rendszer kiválasztása a bukkális film formulációhoz,
- a segédanyagok optimális arányának megállapítása,
- az előállított filmek mikro- és makroszerkezete közötti összefüggések keresése,
- a polimer-arány, a film előállítási módjának és a tárolás hatásának vizsgálata a hatóanyag-leadás *in vitro* kioldódási profiljára,
- a bukkális modellmembránon történő hatóanyagátjutás igazolása.

Módszerek

A B₁₂ vitamin modell hatóanyagból nátrium-alginát (SA) és Carbopol 71 G (CP, poliakrilsav-származék) polimerek felhasználásával, öntéses és fagyasztva szárításos technikával állítottam elő bukkális filmet, illetve ostyát.

A minták infravörös spektrumait FTIR 4200 (Type A) (Jasco International Co. Ltd, Tokyo, Japan) készülékkel, gyengített totálreflexiós (ATR Pro-470H) mérőfejjel a kiindulási anyagok esetében porfeltéttel, filmeknél, ostyáknál pedig elasztikus mintához alkalmas feltéttel végeztem, 300-4000 cm⁻¹ mérési tartományban, 4cm⁻¹ spektrális felbontással.

A hidrogélek viszkozitását AR 2000 Rotational Rheometer típusú reométerrel (TA Instruments, New Castle, USA), 40 mm átmérőjű forgó mérőfejjel, 7,409-74,09/s közötti forgási sebességgel, kémhatásukat "pH 210 Microprocessor pH Meter" (Hanna Instruments, USA) típusú kombinált üvegelektrodos pH-mérő műszerrel határoztam meg.

A pozitron annihilációs élettartam spektroszkópiás (PALS) méréseket kb. 3x10⁵ Bq aktivitású, két Kapton fólia közé csomagolt, hordozómentes ²²NaCl forrással, BaF₂ szcintillációs detektorokkal, gyors-gyors koincidenciakörrel kapcsolt Ortec elektronikával, 3600 s mérési idővel végeztem, a hidrogélek esetében egyedi mérési elrendezéssel. Az adatokat Resolution programmal értékeltem ki. A Doppler-szélesedés (DB) értékeket folyékony N₂-nel hűtött, nagy tisztaságú germánium detektorral (HPGe), Tennelec elektronikával, 10⁶ mérési pontot tartalmazó méréssel határoztam meg. Az energia-felbontás 1,1 keV volt az 511 keV-os csúcsnál.

Az öntött és a liofilizált filmek szilárdságát TA.XT[®]plus (Stable Micro System Ltd., UK) 5000 g-os mérési cellájú állományelemzővel, egyedileg

gyártott, de a gyári feltétellel geometriailag azonos, 8 mm belső átmérőjű feltétellel és 5 mm átmérőjű henger alakú, rozsdamentes acél kutaccsal, valamint Brookfield LFRAC3-4500 típusú (Brookfield Eng. Lab. Inc., USA), 0 - 4500 g-os mérési tartományú állományelemző készülékkel, gyári film-rögzítő feltétellel (Brookfield TA-FS Film Support Fixture, belső átmérő: 10 mm) és TA-8 (6,35 mm átmérőjű, gömb alakú, rozsdamentes acél) kutaccsal mértem. A kiértékelést mindkét módszernél a:

$$\text{törési szilárdság} \left[\frac{N}{mm^2} \right] = \frac{\text{töréshez szükséges erő} [N]}{\text{minta alapterülete} [mm^2]}$$

képlet alapján végeztem.

Az in vitro kioldódás vizsgálatokat Hanson SR-8 Plus kioldódás vizsgáló fürdőben, 3-3 párhuzamos méréssel, USP-2 (lapátos) módszerrel, 50/perc (50 RPM) keverési sebességgel, $37 \pm 0,5$ °C hőmérsékletre temperált, 300 ml térfogatú, pH=6,8-as gyógyszerkönyvi (Ph. Hg. VIII.) foszfát puffert alkalmazva végeztem. A kioldódott hatóanyag mennyiségének meghatározását HPLC-MS módszerrel, Agilent Infinity 1260 folyadékkromatográffal, Agilent 6460 Triple Quad tömegspektrométerrel végeztem, 30 µl minta injektálásával, 0,5 ml/perc áramlási sebességű, 90% ioncserélt vízben 0,1 mol/dm³ HCOOH és 10% acetonitrilt tartalmazó mozgófázissal, 50 mm hosszú, 2,1 mm belső átmérőjű, 3,5 µm szemcseméretű, 25 °C-os oszloptérben elhelyezett, C18 Poroshell 120EC kromatográfiás oszlopon. Az ionizálás detektálás Jet Stream elektropray ionforrással, a detektálás MRM módszerrel, pozitív ionizációs módban, $m/z = 678,5$ ($[M/2+H]^+$) prekursor ionnal, $m/z = 146,9$ termék ionnal történt.

A kioldódási görbéket a Korsmeyer-Peppas (K&P) kinetikai modellel, az alábbi egyenlet alapján értékeltem:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n$$

ahol M_t és M_∞ a kioldódott hatóanyag összegzett (kumulatív) mennyisége t időpillanatban és a végtelen időpontban (amely a teljes hatóanyag-mennyiséget jelenti), a k a sebességi állandó, amely a hatóanyag-polimer rendszer szerkezetétől és geometriájától függ, az n pedig a hatóanyag-leadás transzport-mechanizmusát jellemző állandó.

Eredmények

- Neminvazív mikroszerkezet vizsgáló módszerek (FTIR és PALS) kombinációjával értékeltük a B₁₂ és a hordozó polimerek, másodlagos kölcsönhatásokat érintő, a gyógyszerforma stabilitását befolyásoló interakcióit. A rokon szerkezetű Carbopol polimerek közül a két módszer lehetőséget biztosított, a bukkális formulációhoz előnyös, gyorsan nedvesedő és a mukoadhezivitást biztosító típus kiválasztására [1].
- A SA-CP kompozitoknál meghatározott arány biztosított homogén filmet, ennek meghatározására, a gél-film átmenet vizsgálatára a valós idejű PALS mérést alkalmaztam, először a szakirodalomban [3].
- Vizsgáltam a homogén, öntéses és liofilizált filmek felhasználás szempontjából meghatározó, mikro- és makroszerkezeti tulajdonságait. Megállapítottam, hogy a mikro- és makroszerkezeti tulajdonságok együtt változtak az összetétel függvényében. A mikroszerkezet vizsgáló módszerek alátámasztották az anomális makroszerkezeti viselkedést mutató összetétel azonos alap-, de eltérő szupramolekuláris szerkezetét.
- A CP mennyiségének, a tárolás időtartamának növelése, valamint a liofilizálás csökkentette a hatóanyag felszabadulás sebességét. A

hatóanyagleadás sebességének változásai (a K&P-modell alapján értékelve) a mikroszerkezeti vizsgáló módszerek eredményeivel összhangban voltak.

Következtetések

SA-CP különböző arányú keverékeiből sikerült öntéses és fagyasztva szárítás eljárással bukkális filmet formulálni. A formuláció potenciálisan alkalmas lehet a választott modellhatóanyag, a vízoldékony B₁₂, terápiás dózisú bevitelére.

A készítmény-fejlesztés, a kockázatértékelés szempontjából kritikus, lépéseiben – kompatibilitás, stabilitás – a hagyományos szerkezetvizsgáló módszerek számára láthatatlan szabadterfogat-változás követésével, a dolgozatban alkalmazott PALS és a hozzá kapcsolódó technikák, egyedülálló módszernek bizonyultak.

A PALS technikával kapott mérési eredmények összefüggését elemezve a mechanikai tulajdonságokkal, kezelés, tárolás hatására bekövetkező változásokkal, kioldódási profilokkal, megállapítható, hogy a PALS hasznos módszere lenne a gyógyszerforma-fejlesztésnek, annak szinte valamennyi fázisában.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények

1. **Szabó B**, Süvegh K, Zelkó R. (2011) Effect of storage on microstructural changes of Carbopol polymers tracked by the combination of positron annihilation lifetime spectroscopy and FT-IR spectroscopy. *Int J Pharm*, 416: 160-163.
2. **Szabó B**, Hetényi G, Majoros K, Miszori V, Kállai N, Zelkó R. (2011) Bukkális hatóanyag-leadó rendszerek formulálásának és ex vivo vizsgálatának lehetőségei. *Acta Pharm Hung*, 81: 165-172.
3. **Szabó B**, Süvegh K, Zelkó R. (2012) Real-time positron annihilation lifetime spectroscopy for the detection of the hydrocolloid gel-film transition of polymers. *Polym Test*, 31: 546-549.
4. Sebe I, **Szabó B**, Zelkó R. (2012) A pozitron annihilációs élettartam spektroszkópia és gyógyszerészeti alkalmazása. *Acta Pharm Hung*, 82: 23-32.
5. Kállai N, Sebestyén Z, **Szabó B**, Simon V, Antal I, Zelkó R. (2012) Intraorális gyógyszerformák fejlesztési lehetőségei. *Acta Pharm Hung*, 82: 95-104.

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó, teljes terjedelemben megjelent kongresszusi előadások

6. **Szabó B**, Molnár M, Süvegh K, Zelkó R. (2011) Tracking of the microwave induced supramolecular structural changes of polymers with positron annihilation lifetime spectroscopy. *Eur J Pharm Sci*, 44: (S1) 196-197.

Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó folyóiratban megjelent közlemények

7. Vajdai A, **Szabó B**, Süvegh K, Zelkó R, Újhelyi G. (2012) Tracking of the viability of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteria population in polyvinylalcohol nanofiber webs by positron annihilation lifetime spectroscopy. Int J Pharm, 429: 135-137.
8. Télessy IG, Balogh J, **Szabó B**, Csempesz F, Zelkó R. (2012) Kinetic stability of all-in-one parenteral nutrition admixtures in the presence of high dose Ca^{2+} additive under clinical application circumstances. Nutr. J. 11: 32.
9. Szabó A, **Szabó B**, Balogh E, Zelkó R, Antal I. (2012) Módosított hatóanyagleadású intraartikuláris készítmények. Acta Pharm Hung, 82: 69-74.